

Studies on Relationships between Structure and Function of Hemoglobin Mlwate **ヘモグロビン Mlwateの構造と機能との関係に関する研究**

| | |
|-----|---|
| 著者 | 林 典夫 |
| 号 | 358 |
| 発行年 | 1966 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/18185 |

氏 名 (本 籍) ^{はやし} 林 ^{のり} 典 ^ふ 夫

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 3 5 8 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 4 1 年 3 月 2 5 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 門 課 程 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
(博 士 課 程) 医 化 学 専 攻

学 位 論 文 題 目 Studies on Relationships between
Structure and Function of Hemoglobin
MIwate
ヘモグロビン MIwate の構造と機能との関係に
関する研究

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 菊 地 吾 郎 教 授 葛 西 森 夫

教 授 吉 沢 善 作

論文内容要旨

ヘモグロビンは、典型的なアロステリック蛋白であり、その機能特性について、なお多くの未解決の問題を残しているが、その意味で、ヘモグロビンは、蛋白質一般の構造と機能との関係を解明する上でも、極めて優れた材料である。また、その関係を究明するには、単に正常ヘモグロビンのみならず、種々の異常ヘモグロビンについて、ヘモグロビンの基本的機能である O_2 結合平衡の性質を調べ、その分子構造異常が機能の上にどのように反映されるかを比較検討する事が特に有効である。本論文は上のような観点から、異常ヘモグロビンの一つである Hb-M Iwate について、その構造と機能との関係を追求した研究の報告である。

Hb-M Iwate は $\alpha_2^{87\text{Tyr}} \beta_2^A$ の組成を持ち、その異常構造の α 鎖では、ヘム鉄が 3 価の状態にあり、 O_2 と結合する能力を持たない。この Hb-M Iwate 成分を、黒血病患者の血液から、アンバーライト XE-64 カラムクロマトグラフィーを用いて純粋に分離し、それを実験材料とした。

Hb-M Iwate の O_2 結合平衡を調べてみると、Hb-M Iwate の O_2 親和性は、正常ヘモグロビンである Hb-A より遙かに低く、 O_2 結合 50% 飽和を与える O_2 分圧は、 $pH 7.0$ において、Hb-A の約 5 倍が必要である。 O_2 結合平衡曲線の形は、相互作用係数 (n) の値が、Hb-A では 2.8 であるのに対し、Hb-M Iwate では 1.0 である。Bohr 効果は、Hb-A に比べて非常に小さく、 $pH 7.0$ 附近では殆ど認められず、 $pH 7.5$ 以上で僅かに存在する。Bohr 効果の小さい事はガラス電極を用いた差滴定法によつても確かめられた。

Hb-M Iwate は、Hb-A と同様に、2 M 食塩溶液中で、 $\alpha\beta$, $\alpha\beta$ の dimer に解裂する。しかし、 O_2 結合平衡の性質は、2 M 食塩溶液中でも本質的には変化しない。従つて、Hb-M Iwate の O_2 結合平衡の異常性をもたらしたのは、 $\alpha\beta$, $\alpha\beta$ という dimer 同志の間で働く力ではなく、 α , β 両鎖間に働く相互作用であると考えられる。

Hb-M Iwate は、1 分子中に 2 個の反応性 -SH 基を持つが、これに PCMB を作用させても、 n の値及び O_2 親和性には変化がなく、僅かに高い pH 範囲でみられていた小さな Bohr 効果が消失するよう見えるだけであつた。即ち、-SH 基は、Hb-M Iwate の機能特性の異常にはあまり関係がないと考えられる。

Hb-M Iwate の CO 結合平衡の特徴は、 O_2 結合平衡の場合と似ており、CO 親和性が Hb-A より著しく低い。また、 $n = 1.0$ であり、Bohr 効果も甚だ小さかつた。Hb-M Iwate

てのこのような機能異常性は、恐らく $\text{Hb-M}_{\text{Iwate}}$ の α 鎖が不活性であるためであろうと考えられるので、次に、 $\text{Hb-M}_{\text{Iwate}}$ の α 鎖を、 N_2 中でハイドロサルファイトを用いて還元し、 α 、 β 両鎖が共に CO 結合能を持つ状態にした場合の、 $\text{Hb-M}_{\text{Iwate}}$ の機能特性を、 CO 結合平衡の上で調べてみると、その CO 親和性及び Bohr 効果が増大し、 Hb-A と同じ程度の大きさまで回復する事が知られた。この事実は、 α 鎖のヘム鉄が還元されて CO 結合性を持つようになると、分子状態変化が起り易くなり、このため β 鎖の反応性を制限していた α 、 β 両鎖間の相互作用が変化し、正常な CO 親和性及び Bohr 効果を示すような高次構造変化が起り得るようになった事を示すものと考えられる。しかし、 $\text{Hb-M}_{\text{Iwate}}$ の α 、 β 両鎖が共に活性な場合には、両鎖間に、 Hb-A におけると同様な相互作用が働くのではないかと期待されるのに反して、 n の値は依然として 1.0 のままにとどまつた。この理由としては、 Hb-A の正常な α 鎖では、87番目のヒスチジンがヘム鉄と結合しているとされているのに対して、 $\text{Hb-M}_{\text{Iwate}}$ では、この87番目のヒスチジンがチロシンで置換されているという事実が、上のような異常機能と関係しているのではないかと考えられる。

$\text{Hb-M}_{\text{Iwate}}$ の機能に異常性をもたらすものとして、 α 鎖の異常のための、 α 、 β 両鎖間の相互作用の変化を考えたのであるが、更に、 $\text{Hb-M}_{\text{Iwate}}$ の高次構造の安定性を、安息香酸ソーダ溶液中でのヘミクローム形成を指標として調べてみると、 $\text{Hb-M}_{\text{Iwate}}$ の α 鎖自身、そのヘム鉄が3価で O_2 や CO と結合しないだけでなく、安息香酸に対して、 Hb-A よりも変性抵抗性が強く、高次構造変化を起し難い事が知られた。

なお、 $\text{Hb-M}_{\text{Iwate}}$ の自酸化速度は、tetramerの状態でも、dimerに解裂した状態においても、 Hb-A のそれより約6倍速かつた。この事実もまた α 、 β 両鎖間の相互作用が、ヘモグロビンの機能に大きな影響を及ぼしている事を推察させる。即ち、 Hb-A では α 鎖と β 鎖との間に自酸化に対して、より安定化させるような相互作用が働いていたものが、 $\text{Hb-M}_{\text{Iwate}}$ では α 鎖の異常によりその相互作用が変化し、 β 鎖が自酸化し易くなつたものと考えられる。

以上の実験成績は、蛋白分子内の1つの subunit の1つのアミノ酸に置換が起ると、その subunit だけでなく、同一分子内のアミノ酸組成の正常な他の subunit の機能にも、大きな影響を与える事、従つて各 subunit は、互いに相互作用を及ぼし合つて、分子全体としての機能を表している事を示唆するものである。また、ヘム間相互作用係数と呼ばれる (n) の値は、必ずしも subunit 間の実際の相互作用の大きさを示すものではない事が明らかにされた。更に、Bohr 効果、ligand との親和性及び結合平衡曲線の形を決める高次構造変化は、各々互いに密接な関連を持つてはいても、実際には各自別々の高次構造変化である可能性が推察される。

審 査 結 果 の 要 旨

著者は異常ヘモグロビンの一つであるHb-M_{Iwate}について、その構造と機能との関係を追求し次のような知見を得た。

まずそのO₂結合平衡を調べてみると、Hb-M_{Iwate}のO₂親和性は、正常ヘモグロビンであるHb-Aより遙かに低く、またO₂結合平衡曲線の形は、相互作用係数(n)の値が、Hb-Aでは2.8であるのに対し、Hb-M_{Iwate}では1.0であつた。Bohr効果は、Hb-Aに比べて非常に小さく、pH 7.3附近では殆ど認められなかつた。Hb-M_{Iwate}を2 M食塩溶液中で、 $\alpha\beta$, $\alpha\beta$ のdimerに解裂しても、O₂結合平衡の性質は本質的には変化しなかつた。Hb-M_{Iwate}は、1分子中に2個の反応性-SH基を持つが、これにPCMBを作用させても、nの値及びO₂親和性には変化がなかつた。Hb-M_{Iwate}のCO結合平衡の特徴もO₂結合平衡の場合と似ており、CO親和性がHb-Aより著しく低い。またn=1.0であり、Bohr効果も甚だ小さかつた。次に、Hb-M_{Iwate}の α 鎖を、N₂中でハイドロサルファイトを用いて還元し、 α , β 両鎖が共にCO結合能を持つ状態にすると、そのCO親和性及びBohr効果が増大し、Hb-Aと同じ程度の大きさまで回復する事が知られた。しかし、Hb-M_{Iwate}の α , β 両鎖が共に活性となつているにもかかわらず、nの値は依然として1.0のままにとどまつた。更に、Hb-M_{Iwate}の高次構造の安定性を調べてみると、Hb-M_{Iwate}の α 鎖自身、そのヘム鉄が3価でO₂やCOと結合しないだけでなく、安息香酸に対して、Hb-Aより変性抵抗性が強く、高次構造変化を起し難い事が知られた。また、Hb-M_{Iwate}の自酸化速度は、tetramerの状態でも、dimerに解裂した状態においても、Hb-Aのそれより約6倍速かつた。

以上の実験成績により、蛋白分子内の1つのSubunitの1つのアミノ酸に置換が起ると、そのSubunitだけでなく、同一分子内のアミノ酸組成の正常な他のSubunitの機能にも大きな影響を与える事、従つて各Subunitは互いに相互作用を及ぼし合つて、分子全体としての機能を現わしている事が示唆された。また、ヘム間相互作用は本来異質の α , β 両鎖間で働くものである事、これには蛋白-SH基の関与は少い事が示された。更に、ヘム間相互作用係数と呼ばれる(n)の値は必ずしもSubunit間の実際の相互作用の大きさを示すものでない事、Bohr効果、ligandとの親和性及び結合平衡曲線の形を決める高次構造変化は、各々互いに密接な関連を持つてはいても、実際には各自別々の高次構造変化である可能性がある事など、ヘモグロビン一般の機能を理解する上で極めて重要な知見が得られた。

よつて本論文は学位を授与するに値するものと認める。